

(様式 3-①)

2016（平成 28）年度
北陸大学特別研究助成金実績報告書（研究成果）

| 研究代表者名 | | 所属 | 職位 | 交付金額 | |
|---------|-----|-----|-------|-------------|-----|
| 村山 次哉 印 | | 薬学部 | 教授 | 2,000,000 円 | |
| 研究分担者 | 所属 | 職位 | 研究分担者 | 所属 | 職位 |
| 野村 政明 | 薬学部 | 教授 | 松原 京子 | 薬学部 | 准教授 |
| 内手 昇 | 薬学部 | 准教授 | 定成 秀貴 | 薬学部 | 講師 |

| | |
|-------|--|
| 研究課題名 | 日和見ウイルス感染症に対する新規治療薬の開発- 作用機序に関する分子基盤機構の解明- |
|-------|--|

1. 研究実績の概要（800字以上（1500字以内）で記入してください。）

【目的】ヒトサイトメガロウイルス（HCMV）感染症は、骨髄・臓器移植後関連や AIDS 関連の日和見感染症として管理すべき重要な疾患の一つである。現在、治療薬として全世界で主にガンシクロビル（GCV）が使用されているが、使用頻度・期間が長期にわたるために、耐性ウイルスの出現や骨髄抑制等の副作用が大きな問題となっており、作用点の異なる新たな治療薬の出現が切望されている。最近、我々が見出したイネ科植物に多く含有されるフラボン誘導体のトリシン（4',5,7-trihydroxy-3',5'-dimethoxyflavone）が、強い抗 HCMV 活性を持ち、安全性も高く、かつ GCV 耐性ウイルスにも効果を示すことが明らかにされた。本研究では、トリシンの抗 HCMV 作用機序を分子レベルで解明し、HCMV 日和見感染症発症の予防・治療の基盤とする事を目的に検討した。具体的には、宿主細胞因子である CC ケモカインの特に CCL2 に着目し検討した。トリシンの抗ウイルス効果の分子基盤が実証されれば非常に意義が深く、新規治療薬としての科学的な根拠ともなり得るので、国際社会への大きな還元となりその意義は大きいと考えられる。

【方法】細胞はヒト胎児肺線維芽細胞（HEL）を、ウイルスは HCMV の Towne 株を、トリシンは有機合成されたものを用いた。HCMV 感染細胞から経時的に RNA を抽出し、cDNA を合成後、Affymetrix 社の方法を用い DNA マイクロアレイによる網羅的な解析を行い、HCMV 感染およびトリシン処理に反応し、10 倍以上の増減が見られる宿主細胞因子を同定した。大きく変動した因子の中から特に CCL2 を選び、real-time RT-PCR 法を用いて CCL2 の遺伝子発現について定量した。また、CCL2 タンパク質発現については、HCMV 感染細胞から経時的に細胞溶解液を調整し、常法に従いウェスタンブロット法により検討した。さらに、CCL2 siRNA の細胞内導入により CCL2 遺伝子をノックダウンした細胞を用いて、HCMV 増殖能についても比較検討した。

【結果】CCL2 の遺伝子発現は、HCMV 感染量及び感染後の時間に依存して増強された。またタンパク質発現に関しても、遺伝子発現と同様の傾向が示された。これらの CCL2 発現量の増加は、トリシン処理により濃度に依存して有意に抑制された。さらに、CCL2 ノックダウン細胞での HCMV 増殖は有意に抑制されたが、ここに CCL2 リガンドを添加する事により対照群のレベルまで回復した。

【考察】以上のことより、宿主細胞因子ケモカイン・CCL2 は HCMV 複製の調節に関与している事が明らかにされた。CCL2 は、急性・慢性炎症反応誘導に関与していることから、炎症局所での潜伏 HCMV の再燃や増殖にも関与し、ひいては日和見感染症発症のトリガーとなる可能性が示唆された。また、トリシンの抗 HCMV 効果の作用機序の 1 つとして CCL2 依存性の機序が示された。これは、GCV 等の核酸アナログとの作用点とは全く異なるユニークで新たな作用点であり、トリシンが新規抗 HCMV 治療薬の候補となる可能性が示唆された。

2. キーワード

| | | |
|----------------|------------|----------|
| (1) サイトメガロウイルス | (2) 日和見感染症 | (3) トリシン |
| (4) ケモカイン | (5) CCL2 | (6) |

(様式 3-①)

3. 研究成果の活用 (研究成果の活用及び今後の活用方法について、詳しく具体的に記載してください。)

これまでの研究成果として、HCMV に対して抗ウイルス効果を示すトリシン化合物の作用機序の検討から、宿主細胞因子であるケモカイン・CCL2 依存性の機序の存在が明らかにされた。これは、ヌクレオシド類自体である GCV が三リン酸化され活性型となった後、DNA ポリメラーゼの基質として作用し競合することによりウイルス DNA 合成を阻害する作用点とは全く異なるユニークで新たな作用点であり、トリシンが新規抗 HCMV 治療薬の候補となる可能性が示唆された。その活用法として、以下のような可能性が考えられる。

HCMV は、臓器移植患者や AIDS 患者、癌末期患者などの多くにみられる日和見感染症のうち代表的な日和見感染ウイルスである。従って HCMV 日和見感染症を予防あるいは治療できれば、単なる抗 HCMV 薬にとどまらず代替医療薬として有力な抗日和見感染症薬になりうる可能性がある。また、これまでの多くの共同研究者との協力により、トリシンは HCMV 以外にも単純ヘルペスウイルス (HSV)、帯状疱疹ウイルス (VZV)、B 型肝炎ウイルス (HBV) 等の DNA ウイルス、およびインフルエンザウイルスやエイズウイルス、ジカウイルス等の RNA ウイルスに対しても抗ウイルス効果を発揮する事が明らかにされている。さらに、抗腫瘍作用を示す事も報告されている。このような多くの薬効や安全性を踏まえ、今後の具体的な活用法としては、この化合物を医薬品として研究開発するにはまだかなりの時間と経費を必用とするために直ぐに製品化することはハードルも高く困難であると思われる。しかしながら、トリシンが多く含有されているイネ科植物であるクマザサからの抽出物を用いて、直接経口摂取できるサプリメントや健康食品として開発する方向性は、医療費の高騰が社会問題化している昨今において新しい活用法の方向性であり、実現できる可能性が高い。今後、さらに経口投与による有効性や安全性が確認されれば、特許の申請、事業化協力企業の探索等を得て、サプリメントや健康食品として製品化できる可能性がある。

4. 研究発表

(1) 雑誌論文

| | | | | | |
|-----|--|----------|--|-------|--|
| 著者名 | R. Yamada, H. Suda, H. Sadanari, K. Matsubara, Y. Tuchida, T. Murayama | 論文 標題 | Synergistic effects of combination treatment with ganciclovir and tricin on human cytomegalovirus replication <i>in vitro</i> (ヒトサイトメガロウイルス複製に対する GCV とトリシンによる併用療法による相乗効果) | | |
| 雑誌名 | Antiviral Research | 巻 | 発行年 | ページ | |
| | | 125 | 2016 年 | 79-83 | |

(2) 図 書

| | | | | | |
|-----|------------------------------|--------|----------|--|--|
| 著者名 | 村山次哉 | 出版社 | 医薬ジャーナル社 | | |
| 書名 | 化学療法の領域「特集・飛躍的に発展を見せる抗ウイルス薬」 | 発行年 | 総ページ数 | | |
| | | 2017 年 | 33-38 | | |

(3) 学会発表

| | | | | | |
|-----|--------------------------------|----------|---|---------|---------------|
| 学会名 | 第 26 回抗ウイルス療法学会総会 | 発表 課題 | 抗ヒトサイトメガロウイルス活性のある tricin のインターフェロン誘導性遺伝子発現に対する影響について | | |
| 発表者 | 茂木香保里、定成秀貴、山田理恵、松原京子、武本眞清、村山次哉 | 開催 日 | 2016 年 5 月 13-15 日 | 開催 地 | 名古屋市 |
| 学会名 | 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 | 発表 課題 | 抗炎症薬によるヒトサイトメガロウイルス複製の抑制 | | |
| 発表者 | 村山次哉、赤井佑三子、定成秀貴、山田理恵、武本眞清、大黒 徹 | 開催 日 | 2016 年 10 月 23-25 日 | 開催 地 | 札幌コンベンションセンター |

(様式 3-①)

| | | | | | | | |
|-----|--|------|---|---------------------|--|-----|------------------------|
| 学会名 | 第 64 回日本ウイルス学会学術集会 | 発表課題 | インターフェロン誘導性遺伝子発現に対する抗ヒトサイトメガロウイルス活性のある tricin の影響について | | | | |
| 発表者 | 定成秀貴、茂木香保里、山田理恵、武本眞清、大黒 徹、村山次哉 | | 開催日 | 2016 年 10 月 23-25 日 | | 開催地 | 札幌コンベンションセンター |
| | | | | | | | |
| 学会名 | 第 19 回日本補完代替医療学会学術集会 | 発表課題 | イネ科植物含有成分によるヒトサイトメガロウイルスの増殖抑制効果 | | | | |
| 発表者 | 赤井佑三子、定成秀貴、武本眞清、大黒 徹、村山次哉 | | 開催日 | 2016 年 11 月 26-27 日 | | 開催地 | 石川県文教会館 |
| | | | | | | | |
| 学会名 | 第 19 回日本補完代替医療学会学術集会 | 発表課題 | 抗ヒトサイトメガロウイルス活性のある tricin がインターフェロン誘導性遺伝子発現に影響を与える | | | | |
| 発表者 | 茂木香保里、定成秀貴、武本眞清、大黒 徹、村山次哉 | | 開催日 | 2016 年 11 月 26-27 日 | | 開催地 | 石川県文教会館 |
| | | | | | | | |
| 学会名 | 日本薬学会第 137 回年会 | 発表課題 | 日和見ウイルス感染症に対する宿主因子依存性抗ウイルス薬の検索 | | | | |
| 発表者 | 赤井佑三子、定成秀貴、茂木香保里、武本眞清、松原京子、大黒 徹、村山次哉 | | 開催日 | 2017 年 3 月 24-27 日 | | 開催地 | 仙台市 |
| | | | | | | | |
| 学会名 | 17th International Congress on Infectious Diseases | 発表課題 | Inhibition of CCL2 dependent human cytomegalovirus replication by tricin (トリシンによる CCL2 依存性 HCMV 複製の抑制) | | | | |
| 発表者 | T. Murayama, R. Yamada, K. Matsubara, H. Sadanari | | 開催日 | 2016 年 3 月 2-5 日 | | 開催地 | Hyderabad, India |
| | | | | | | | |
| 学会名 | 2 nd World Congress & Expo on Pharmaceuticals & Drug Delivery Systems (Pharmaceutics- 2017) | 発表課題 | Inhibition of host factor-dependent human cytomegalovirus replication by tricin (トリシンによる宿主因子依存性 HCMV 複製の抑制) | | | | |
| 発表者 | T. Murayama, H. Sadanari, M. Takemoto, K. Matsubara, T. Daikoku | | 開催日 | 2017 年 3 月 27-28 日 | | 開催地 | Kuala Lumpur, Malaysia |

- [備考] 1. 各記入欄とも、スペースに限りがあるので、必要に応じて適宜コピーしてください。
 2. 外国語のものについては、日本語訳を付けてください。